

Z. klin. Chem. u. klin. Biochem.  
8. Jg., S. 134—136, März 1970

## Eine neue Methode zur photometrischen Bestimmung der Triglyceride (Neutralfette)

Von J. HOEFTMAYR<sup>1)</sup> und R. FRIED

unter technischer Mitarbeit von A. Cordua und G. Knecht

*Aus den wissenschaftlichen Laboratorien der Firma Dr. Heinz Haury, München 23*

(Eingegangen am 9. Oktober 1969)

Bei der beschriebenen Methode zur Bestimmung der Triglyceride werden nach Fällung des freien Cholesterins und nach Adsorption der Phosphatide an Kieselgel die restlichen Esterbindungen nach der Hydroxamsäuremethode und das veresterte Cholesterin nach der LIEBERMANN-BURCHARD-Reaktion jeweils in mVal/l ermittelt. Die Differenz stellt den Wert der Triglyceride dar. Einzelheiten der Bedingungen und die Durchführung werden beschrieben. Kritische Anmerkungen befassen sich mit der Fehlerbreite, der Genauigkeit (Variationskoeffizient) und der Korrelation zur enzymatischen Triglyceridbestimmung.

### *A new method for the photometric determination of triglycerides (neutral fats)*

A method is described for the determination of triglycerides. After precipitation of the free cholesterol and adsorption of the phosphatides on kieselgel, the remaining total esters are determined by the hydroxamic acid method and the cholesterol esters by the LIEBERMANN-BURCHARD reaction, both in meq/l. The difference represents the triglycerides. Details of the conditions and procedure are given. The error, the accuracy (variation coefficient) and correlation with the enzymic determination of triglycerides are critically discussed.

Die Bestimmung der Triglyceride sollte zur differentialdiagnostischen Abklärung von Fettstoffwechselstörungen in jedem Fall durchgeführt werden. Wenn dies unterlassen wurde, so liegt das an den Schwierigkeiten, welche die bisher bekannten Methoden im Routine-laboratorium mit sich bringen.

Zwei Methoden werden im allgemeinen für die direkte Bestimmung der Neutralfette angewendet. Nach der Methode von CARLSON und WADSTRÖM (1) werden die Triglyceride im Serum nach einer Reihe von acht Arbeitsschritten als Formaldehyd, der durch Oxydation von Glycerin entstanden ist, mittels Chromotropsäure als Farbreagenz bestimmt. Die zahlreichen Arbeitsschritte und die schlechte Haltbarkeit des Farbreagenz sind ein großer Nachteil dieser Bestimmungsmethode. Eine andere, sehr elegante Methode wurde von EGGSTEIN und KREUTZ (2) angegeben. Sie beruht auf drei gleichzeitig im Bestimmungsansatz ablaufenden Fermentreaktionen, deren spezifisches Substrat in der ersten Stufe das Glycerin ist und deren dritte Stufe die NADH verbrauchende LDH-Reaktion ist. Zwar sind hier nur drei Arbeitsschritte notwendig, was gegenüber der CARLSON-Methode einen Fortschritt bedeutet, doch erfordert die Herstellung und exakte Einstellung der zahlreichen Reagenzlösungen einen großen Arbeitsaufwand. Die Haltbarkeit der Fermentlösungen ist teilweise auch bei Aufbewahrung im Kühlschrank auf wenige Tage begrenzt. Für die Durchführung der Bestimmung müssen besondere Anforderungen an Sorgfalt und Erfahrung gestellt werden, die im Routine-laboratorium nicht leicht erreicht werden.

Unsere Methode geht von folgender Überlegung aus: Gelingt es, aus einem Serum das freie Cholesterin und

die Phosphatide zu entfernen, so finden sich im verbleibenden Reaktionsansatz nur noch die Triglyceride einschließlich der Mono- und Diglyceride und das veresterte Cholesterin. Bestimmt man nun die Gesamt-Esterbindungen und die des veresterten Cholesterins in mVal/l, so muß die Differenz der beiden den Esterbindungen der Triglyceride ebenfalls in mVal/l entsprechen.

Voraussetzung für die Realisierung war, ein Lösungsmittel zu finden, das die vollständige quantitative Adsorption der Phosphatide an Kieselgel gewährleistet und gleichzeitig die Bestimmung der Esterbindungen nach der Hydroxamsäuremethode (4) sowie die des veresterten Cholesterins nach der LIEBERMANN-BURCHARD-Reaktion (5) zuläßt. Das von CARLSON verwendete Chloroform kommt hierfür nicht in Frage, da der sich im alkalischen Milieu daraus bildende Orthoameisensäureester die Hydroxamsäuremethode stört. Dagegen erwies sich eine Mischung von wasserfreiem Isopropanol und sek. Butanol im Verhältnis 1 : 2 (v/v) als geeignet.

### Reagenzien<sup>2)</sup>

1. Digitoninlösung (0,25proz. in wasserfreiem Isopropanol)
2. Digitonin-Cholesterin-Standard, entsprechend 5,2 mVal/l (0,4 g Cholesterin werden in 1 l einer 0,25proz. Digitoninlösung in Isopropanol gelöst)
3. Cholesterin-Reagens (0,05M 2,5-Dimethyl-benzol-sulfonsäure in einem Gemisch aus 300 ml Essigsäureanhydrid und 200 ml Eisessig)
4. Sek. Butylalkohol
5. Adsorptionsmittel (100 mg aktiviertes Kieselgel pro Kapsel)
6. Hydroxylaminhydrochloridlösung (11proz. in Methanol)

<sup>1)</sup> Teilweise vorgetragen auf der 13. Jahresversammlung der Schweizerischen Vereinigung für Klinische Chemie, 18.—20. April 1969 in Lugano, Kurzreferat Schweiz. med. Wschr. 99, 1826 (1969).

<sup>2)</sup> Haury-Test „Triglyceride“ Dr. H. Haury, Chemische Fabrik, München 23, Postfach 48.

7. Triolein-Standard, entsprechend 17 mVal/l Triolein (0,334 g Triolein werden in 0,334 l 0,5proz. Digitoninlösung in Isopropanol gegeben und mit 0,66 l sek. Butanol aufgefüllt)
8. 10proz. Eisen[III]-chloridlösung in 0,1N Salzsäure
9. 10proz. Natronlauge
10. Salzsäure, mindestens 3,8N
11. Konzentrierte Schwefelsäure.

## Methodik

### Entfernung des freien Cholesterins

0,5 ml Serum werden mit 2,0 ml Digitoninlösung versetzt. Der Ansatz wird kurz aufgeschüttelt und bleibt anschließend 10 Min. stehen. Nach dem Zentrifugieren und Abgießen in ein trockenes Reagenzglas erhält man den Überstand I. Von diesem Überstand I werden 1 ml zur Eliminierung der Phosphatide und anschließenden Bestimmung der restlichen Esterbindungen und später 0,2 ml zur Bestimmung des veresterten Cholesterins eingesetzt.

### Entfernung der Phosphatide

In ein trockenes Reagenzglas werden 200 mg Kieselgel (Inhalt von 2 Kapseln) gegeben, dazu 1,0 ml vom Überstand I und daran anschließend 2,0 ml sek. Butylalkohol. Ein gleichfalls angesetzter Leerwert enthält 1,0 ml sek. Butylalkohol und 0,5 ml Digitoninlösung. Während der Leerwert nur gut gemischt werden muß, wird die Analyse 5 Min. kräftig geschüttelt. Nach dem Abzentrifugieren des Analysenansatzes erhält man den Überstand II. Es ist besonders darauf zu achten, daß vom Adsorptionsmittel nichts in den Überstand gebracht wird.

### Bestimmung der restlichen Esterbindungen

In drei neue vorbereitete Reagenzgläser werden nacheinander für Analyse, Standard und Leerwert einpipettiert: Je 0,5 ml einer 10proz. Natronlauge und anschließend je 0,5 ml Hydroxylaminhydrochlorid-Lösung. In den Analysenansatz werden 1,0 ml des Überstandes II, in den Standard 1,0 ml des Triolein-Standards und in den Leerwert 1,0 ml des bei Entfernung der Phosphatide erhaltenen Leerwertgemisches gegeben. Alle Ansätze bleiben nunmehr 60 Min. bei Raumtemperatur stehen. Danach werden in alle drei Röhrchen je 0,5 ml 3,8N Salzsäure und 0,5 ml Eisen[III]-chloridlösung pipettiert. Nach dem Mischen und nach einer Pause von 20 Min. werden Standard und Analyse gegen den Leerwert bei einer Wellenlänge zwischen 500 und 550 nm gemessen.

Für die Berechnung gilt die Gleichung

$$\frac{\text{Extinktion Analyse}}{\text{Extinktion Standard}} \cdot 17 = \text{mVal/l Esterbindungen}$$

### Bestimmung des veresterten Cholesterins

In drei vorbereitete Reagenzgläser werden jeweils pipettiert: 2,0 ml Cholesterinreagenz. In den Analysenansatz werden 0,2 ml des Überstandes I, in den Standardansatz 0,2 ml Digitonin-Cholesterin-Standard und in den Leerwert 0,2 ml Digitoninlösung gegeben. Die Proben, die sich leicht erwärmen, bleiben 10 Min. bei Raumtemperatur stehen und werden anschließend mit jeweils 0,3 ml konz. Schwefelsäure versetzt. Unter neuem Erwärmen bleiben die Proben 10–15 Min. bei diffusem Tageslicht stehen. Danach werden Analyse und Standard gegen den Leerwert bei einer Wellenlänge zwischen 560 und 590 nm gemessen. Der Geradenheit der Eichkurve entsprechend gilt die Berechnungsgleichung:

$$\frac{\text{Extinktion Analyse}}{\text{Extinktion Standard}} \cdot 5,2 = \text{mVal/l verestertes Cholesterin}$$

Berechnung der Triglyceride: mVal/l Gesamt-Esterbindungen — mVal/l verestertes Cholesterin = mVal/l Triglyceride.

## Kritik der Methode

1. Um die Frage zu klären, ob das veresterte Cholesterin auch tatsächlich im richtigen Bereich erfaßt wird, wurden eine Reihe von Seren in getrennten Arbeitsgängen auf das Gesamt-Cholesterin und auf das veresterte und freie Cholesterin untersucht. Die Summe von freiem und verestertem Cholesterin war im Bereich der Fehlerbreite der Methode von  $\pm 3\%$  gleich dem Gehalt an Gesamt-Cholesterin.

2. Die unterschiedlichen Absorptionsmaxima von Digitonin und Cholesterin bei Wellenlängen über 550 nm sowie das Mitführen eines Digitonin-Cholesterin-Standards schließen einen durch den Digitoningehalt der Analyse entstehenden Fehler aus, worauf früher schon hingewiesen wurde (6, 7).

3. Nach der Behandlung mit aktiviertem Kieselgel darf der verbleibende Ansatz keine Phosphatide mehr enthalten. Wir konnten dann keine Phosphatide im Überstand nachweisen, wenn der Reaktionsansatz nach Zugabe des Adsorptionsmittels 5 Min. geschüttelt worden war. Die einfache Zugabe des Adsorptionsmittels genügt also nicht.

4. Der Einwand von EGGSTEIN (3), daß die Hydroxamsäurebildung der Fettsäure-Cholesterinester nur in absolut wasserfreiem Milieu erfolgt, während im teilweise wäßrigen Milieu eine solche Reaktion nicht stattfindet, legt den Gedanken nahe, Reaktionsbedingungen zu suchen, bei denen nur die Triglyceride und nicht die Cholesterinester zu den Hydroxamsäuren verseift werden. Man könnte dann nach Entfernung der Phosphatide auf einfache Weise die Triglyceride bestimmen. Dies war leider nicht möglich. Im Gegensatz zu EGGSTEIN, der seine Versuche mit Cholesterinpalmitat und -stearat und unter anderen Einwirkungszeiten durchgeführt hat, konnten wir feststellen, daß unter den von uns gewählten Versuchsbedingungen Cholesterinester von ungesättigten Fettsäuren zu 99–100% und von gesättigten Fettsäuren zu 75% zu Hydroxamsäuren verseift werden. Nun machen die gesättigten Fettsäure-Cholesterinester etwa 20% der gesamten Cholesterinester aus, so daß bei der Triglyceridbestimmung die Werte um höchstens 5% niedriger zu erwarten sind.

Wenn man die in der Tabelle 1 aufgeführten Wertepaare addiert, so zeigt sich, daß die mit der angegebenen

Tab. 1  
Photometrische Bestimmung der Triglyceride.  
Vergleich der beschriebenen mit der enzymatischen Methode

Serum Nr.	Triglyceride [mVal/l]		
	Beschriebene Methode	Methode nach EGGSTEIN (2)	Angebener Wert
1.	192,6	205,0	
2.	310,5	274,0	
3.	82,0	78,6	
4.	100,1	113,8	
5.	134,5	131,3	
6.	111,2	121,0	
7.	86,7	96,2	
8.	227,0	259,0	
9.	127,0	149,0	
10. Moni-Trol I	155,0	156,0	81
11. Moni-Trol II	109,0	110,0	50
12. Hyland-Spezial	73	69	75 (65–85)
13. Hyland-Spezial	70,2	87,4	75
14. Hyland-Spezial	72,0	—	70

Methode gefundenen Ergebnisse im Durchschnitt nur um 3,8% niedriger als die der Vergleichsmethode liegen. Der Korrelationskoeffizient zur Methode von EGGSTEIN errechnet sich mit  $r = 0,964$ .

5. Die Reproduzierbarkeit der beschriebenen Methode wurde durch die Berechnung des Variationskoeffizienten (VK)<sup>3)</sup> geprüft. Zugrunde liegen dem VK die Ergebnisse von fünf verschiedenen Serien, an denen je 10 Untersuchungen vorgenommen wurden. Da zwei Ar-

<sup>3)</sup> VK = mittlerer Fehler der Einzelmessung fm ausgedrückt in % des Mittelwertes:  $fm = \sqrt{\frac{\sum (f)^2}{n-1}}$ .

beitsschritte notwendig sind, müssen jedoch zwei VK ermittelt werden. Der VK für die Bestimmung des veresterten Cholesterins beträgt 2,66, der für die restlichen Esterbindungen 2,14. Da sich die Fehler addieren können, ist der VK für die Gesamtbestimmung im ungünstigsten Fall mit 4,8 anzusetzen.

6. Vielfach wird der Wert nicht in mVal/l, sondern in mg/100 ml gewünscht. Bezieht man das Ergebnis auf Triolein, so müssen die mVal/l mit 29,5 multipliziert werden. Wird jedoch auf Triglyceride mit einem durchschnittlichen Molekulargewicht der Serumfettsäuren von 275 bezogen, so ist der Faktor 28,5 einzusetzen.

### Literatur

1. CARLSON, L. A. und L. B. WADSTRÖM, Clin. chim. Acta Amsterdam 4, 197 (1959). — 2. EGGSTEIN, M. und F. H. KREUTZ, Klin. Wschr. 44, 262 (1966). — 3. EGGSTEIN, M., diese Z. 4, 12 (1966).
4. FRIED, R. und J. HOEFLMAYR, Klin. Wschr. 41, 727 (1963).
5. FRIED, R. und J. HOEFLMAYR, Med. Klin. 64, 1320 (1969).
6. HOEFLMAYR, J. und R. FRIED, Med. Welt, 2015 (1964). —
7. HOEFLMAYR, J. und R. FRIED, Ergebn. Labor.-Med. 2, 119 (1965).

Dr. med. Joachim Hoeftmayr  
Dr. rer. nat. Rudolf Fried  
8 München 13  
Schleißheimer Str. 343